125—130

动 物 学 研 究 1998, 19 (2): 125—130 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

浙江地方猪种线粒体 DNA 多态及遗传多样性研究*

章胜乔[①②] 徐继初[①] 张亚平[②③] 傅 衍[①] 陈永久[②]
(① 浙江农业大学动物科学学院 杭州 310029)
(② 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)

摘要 本实验用 *Apa* Ⅰ、*Ava* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、*Bcl* Ⅰ、*Bgl* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ、*Cla* Ⅰ、*Dra* Ⅰ、*Eco* RⅠ、*Eco* RV、*Hae* Ⅱ、*Hinc* Ⅱ、*Hind* Ⅲ、*Hpa* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*Pst* Ⅰ、*Pvu* Ⅰ、*Pvu* Ⅱ、*Sac* Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Sca* Ⅰ、*Sma* Ⅰ、*Stu* Ⅰ、*Xba* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ等 25 种识别 6 个碱基对的限制性内切酶分析了浙江地方品种猪、浙江野猪等 30 个个体的线粒体 DNA，共检出 30 种限制性态型 (morph)，可归结成 3 种单倍型，其中 *Bam*H Ⅰ-B、*Bcl* Ⅰ-B、*Dra* Ⅰ-B 和 *Xba* Ⅰ-C 为首次发现；各单倍型间平均遗传距离 ($\bar{p}$) 为 0.005，群体的平均多态度 ($\bar{\pi}$) 为 0.0008，均处于遗传多样性贫乏范围，提示浙江地区猪可能起源于一个共同的祖先。结合前人资料，对金华Ⅲ系猪进行分析，分析结果提示金华Ⅲ系猪可能有两个母系起源。

关键词 线粒体 DNA，限制性片段长度多态性，猪
中图分类号 S828·2

高等动物线粒体 DNA（mtDNA）是共价闭合的环状双链 DNA 分子，大小为 16.5 kb 左右，其基因组的组织结构简单、稳定，具有进化速度快（是单拷贝核 DNA 的 5—10 倍），呈母系遗传，无组织特异性及提取方便等特点。由于 mtDNA 具有这些特点，近年来 mtDNA 的研究在家养动物近缘种间或种内种群间亲缘关系的研究中得到普遍的重视，并取得许多令人瞩目的成果（张亚平等，1992）。目前已清楚了牛、鸡、马等的 mtDNA 全序列，且在家猪的起源、遗传分化及亲缘关系等方面 mtDNA 限制性片段长度多态性（RFLP）技术也已得到较广泛的应用(秦树臻[④]；黄勇富[⑤]；兰宏等，1995；Watanabe 等，1985，1986)。

根据《中国猪品种志》，猪在动物分类学上属于偶蹄目（Artiodactyla）、猪科 (Suidae)、猪属（*Sus*)。猪属动物出现于中新世，距今 25—600 万年。从发源地东南亚扩展到中亚、东亚和欧洲。现一般认为，家猪是在距今约 1 万年前开始，由居住在世界不同地区的各个民族通过长期对野猪（*S. scrofa*）的驯化而来的。据考古学研究发现，浙江家猪是在距今约 7 千年前开始形成的；研究还发现，世界野猪可能起源于亚洲野猪，不同地方品种可能具有不同的起源。

浙江省地方猪种遗传资源十分丰富，据《浙江省畜禽品种志》介绍有金华猪、嘉兴黑猪（太湖猪的类群之一）等 14 个地方品种，有 6 个品种载入《中国猪品种志》。然而，目

* 国家自然科学基金、国家杰出青年科学基金、云南省科委“二百人计划”和浙江省自然科学基金资助项目
③ 联系人
④ 秦树臻，1994. 太湖猪核 DNA 和线粒体 DNA 遗传变异的研究. 南京师范大学，博士论文
⑤ 黄勇富，1996. 中国地方猪种遗传多样性及亲缘分化关系. 四川农业大学，博士论文
本文 1997-02-19 收到，1997-05-23 修回

前我们对猪遗传资源的认识还处于一个较低水平，虽出版有《中国猪品种志》和《浙江省畜禽品种志》，但多是基于地理分布、体型外貌、生产性能和表型来划分猪品种的。限于当时条件，这种划分具有局限性。随着生物技术的发展，我们已有可能根据动物的遗传基因去探索家猪起源和品种间的亲缘关系。最近，我国学者已对部分浙江地方猪进行了细胞遗传学研究和生化遗传学研究[1]（吴平等，1995）。然而，在分子水平上只有一些零星的报道[2,3]（吴平等，1995）。

本文采用 mtDNA RFLP 技术，对浙江省具代表性的 7 个地方品种猪以及长白猪和浙江野猪进行分析，试图从分子水平上为浙江省地方猪的起源、遗传分化等问题的研究提供参考资料，为今后猪品种的重新划分、保存和开发利用提供理论依据，而且也为全国、乃至全球的家养动物保种作好接轨工作。

1 材料与方法

1.1 动物来源

我们采集了浙江省嘉兴黑猪（3 头，嘉兴）、金华猪（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ系，各 3 头，金华）、玉江猪（3 头，江西玉江）、碧湖猪（3 头，丽水）、虹桥猪（3 头，乐清）、嵊县花猪（3 头，嵊县）、岔路猪（3 头，宁海）7 个具代表性的地方猪品种的 27 个个体和浙江野猪（3 头，杭州）的内脏组织（肝或肾），样本总数为 30 头。所采集的动物品种尽量采自育种场以排除商品猪血统的干扰。

1.2 试剂

限制性内切酶购自华美生物技术公司和美国 Promega 公司；DNase-free RNase-Ⅰ为德国 Boehringer Mannheing 公司产品；SDS 为 Servi 进口分装，用时重结晶；其他试剂为国产分析纯。

1.3 mtDNA 的提取、检测及纯化

采用王文等(1993)的碱变性方法。

1.4 限制性内切酶消化与电泳

参照兰宏等(1995)的方法。

1.5 电泳结果分析

运用片段法（Nei 等，1979），根据限制性内切酶图谱算出限制性类型（mtDNA 基因单倍型）间的片段共享度 F 和遗传距离 P，根据单倍型在群体中的分布，计算出群体遗传多态程度 π、两群体间的平均多态度 $\bar{\pi}$ 及净遗传距离 δ；根据 P 和 δ 构建 UPGMA 分子聚类图。

2 结果

本实验用 25 种识别 6 个碱基对的限制性内切酶消化猪的 mtDNA，所产生的各种限制性片段长度见表 1。经统计猪的 mtDNA 分子量为 16.3±0.1 kb（$n=30$），与有关报道基本一致（兰宏等，1995；Watanabe 等，1985，1986）。在 30 个个体中共检出 84 个限制性位点，30 种限制性态型（morph），其中只有 *Bam*HⅠ、*Bcl*Ⅰ、*Dra*Ⅰ、*Eco*RⅠ和 *Xba*Ⅰ 5 种酶具有多态，其余酶均表现为单态。*Bam*HⅠ-B、*Bcl*Ⅰ-B、*Dra*Ⅰ-B 和 *Xba*Ⅰ-C 4 种态型为首次报道。为了统一起见，多态型的命名尽量与已报道的命名一致（兰宏等，1995；黄勇富[3]；Watanabe 等，1985），新出现的多态型（*Bam*HⅠ-B、*Bcl*Ⅰ-B、*Dra*Ⅰ-B 和 *Xba*Ⅰ-C）则根据它们在群体中出现频率的高低顺序命名。根据多态型在群

---

(1) 吴小秋，1996. 全国地方猪血液蛋白多态性研究. 贵州农学院，硕士论文

(2) 秦树臻，1994. 太湖猪核 DNA 和线粒 DNA 遗传变异的研究. 南京师范大学，博士论文

(3) 黄勇富，1996. 中国地方猪种遗传多样性及亲缘分化关系. 四川农业大学，博士论文

体中的分布，可将其归结为 3 种不同的单倍型，嘉兴黑猪、金华Ⅰ系、Ⅱ系、Ⅲ系(2 头)、玉江猪、碧湖猪、虹桥猪、嵊县花猪、岔路猪及浙江野猪中的 1 头为Ⅰ型；浙江野猪中的 2 头为Ⅱ型；金华Ⅲ系中的 1 头为Ⅲ型（表 2)。各类型间的遗传距离见表 3。结合前人有关长白猪的资料[1)]，计算出各群体间的平均 mtDNA 多态度和净遗传距离，其中，浙江地方猪、浙江野猪与长白猪的平均多态度和净遗传距离分别为 0.480、0.672 和 0.432、0.600；浙江地方猪与浙江野猪则分别为 0.211 和 0.171。图 1、图 2 分别是 mtDNA 单倍型和群体间 UPGMA 聚类图。

表 1 猪 mtDNA 限制性态型和片段长度

Table 1 Restriction morphs of mtDNA and fragment length of pigs

内切酶	个体数	识别位点数	酶切片段长度(kb)
Apa Ⅰ	30	3	11.5、4.2、0.6
Ava Ⅰ	30	2	11.6、4.7
Bam HⅠ-A	29	5	10.3、2.1、1.8、1.15、0.95
Bam HⅠ-B	1	5	10.0、2.1、1.8、1.45、0.95
Bcl Ⅰ-A	29	8	5.9、2.4、2.05、1.8、1.6、1.35、0.75、0.45
Bcl Ⅰ-B	1	7	5.9、2.95、2.4、2.05、1.8、0.75、0.45
Bgl Ⅰ	30	3	6.7、5.5、4.1
Bgl Ⅱ-A		3	Watanabe 等，1985、1986
Bgl Ⅱ-B	30	1	16.3
Cla Ⅰ	30	2	9.0、7.3
Dra Ⅰ-A	29	7	6.5、2.2、2.1、1.8、1.4、1.2、1.2
Dra Ⅰ-B	1	7	6.5、2.2、2.1、1.8、1.4、1.3、1.1
Eco RⅠ-A	28	3	8.2、5.0、3.1
Eco RⅠ-B	2	4	5.0、4.4、3.8、3.1
Eco RⅤ-A	30	1	16.3
Eco RⅤ-B		2	Watanabe 等，1985、1986
Hae Ⅱ	30	0	
Hinc Ⅱ	30	5	6.9、3.1、2.9、2.4、1.0
Hind Ⅲ	30	4	9.2、4.2、2.4、0.5
Hpa Ⅰ	30	2	13.2、3.2
Kpn Ⅰ	30	1	16.3
Pst Ⅰ	30	3	9.3、5.4、1.6
Pvu Ⅰ-A	30	0	
Pvu Ⅰ-B		1	黄勇富[1)]
Pvu Ⅱ	30	2	10.1、6.2
Sac Ⅰ	30	2	15.5、0.8
Sal Ⅰ	30	1	16.3
Sca Ⅰ-A		9	黄勇富[1)]
Sca Ⅰ-B	30	9	3.1、3.1、2.3、1.8、1.7、1.4、1.3、0.9、0.7
Sma Ⅰ	30	0	
Stu Ⅰ-A		9	Watanabe 等，1985
Stu Ⅰ-B	30	8	3.8、3.5、3.4、2.9、1.05、0.75、0.5、0.4
Xba Ⅰ-A	28	3	9.3、5.7、1.3
Xba Ⅰ-B		2	黄勇富[1)]
Xba Ⅰ-C	2	1	16.3
Xho Ⅰ	30	0	

1) 黄勇富，1996 中国地方猪种遗传多样性及亲缘分化关系. 四川农业大学，博士论文

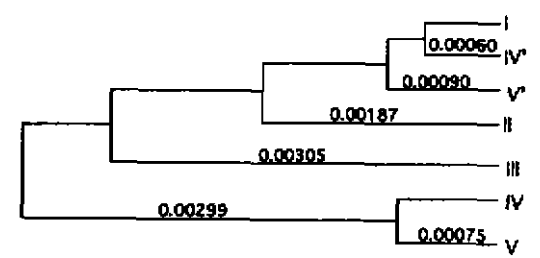


图 1 单倍型间 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPMGA dendrograms among the haplotypes

图中数据为遗传距离(data in the figure are the genetic distances)。

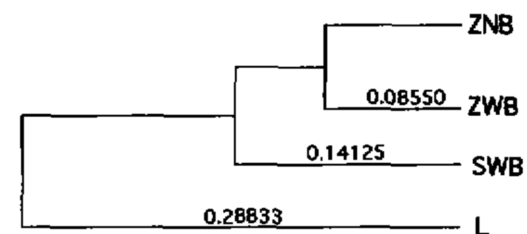


图 2 群体间 UPMGA 聚类图

Fig. 2 UPMGA dendrograms among the populations

ZNB：浙江地方猪(Zhejiang native breeds)；ZWB：浙江野猪(Zhejiang wild boar)；SWB：四川野猪(Sichuan wild boar)；L：长白猪(Landrace)。图中数据为净遗传距离(data in the figure are the genetic distances)。

表 2 猪的单倍型及分布频率（%）

Table 2 Haplotypes of pigs and their frequencies in population (%)

单倍型	个体数	频 率	限制性态型									
			*Bam*H Ⅰ	*Bcl* Ⅰ	*Bgl* Ⅱ	*Dra* Ⅰ	*Eco*R Ⅰ	*Eco*R Ⅴ	*Pvu* Ⅱ	*Sca* Ⅰ	*Stu* Ⅰ	*Xba* Ⅰ
Ⅰ	27+2*+60**	84.0	A	A	B	A	A	A	A	B	B	A
Ⅱ	2	1.9	A	A	B	A	B	A	A	B	B	C
Ⅲ	1	0.94	B	B	B	B	A	A	A	B	B	A
Ⅳ*	10	9.4	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
Ⅴ*	1	0.94	A	A	A	A	A	B	B	A	A	A
Ⅳ**	2	1.9	A	A	B	A	A	B	A	B	B	A
Ⅴ**	1	0.94	A	A	B	A	A	A	A	A	B	A

*、**数据来自黄勇富①(data from Huang)；*长白猪(Landrace)；**全国地方猪(native pigs in China)。

3 讨论

3.1 浙江地方猪 mtDNA 遗传多样性

单倍型间的平均遗传距离（$\overline{P}$）是衡量一个群体 mtDNA 变异程度经常使用的一个指标。本实验浙江地方猪和浙江野猪的$\overline{P}$为 0.005，处于遗传多样性贫乏范围（0.001—0.007)。然而群体平均多态度$\overline{\pi}$，目前被认为是衡量一个给定群体 mtDNA 多态性更好的指标。$\overline{\pi}$值越小，群体的多态程度（多样性）越低。由于该值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例，因而在衡量一个群体 mtDNA 多态程度时比单纯的$\overline{P}$值要精确（兰宏等，1995)。本实验的$\overline{\pi}$值为 0.08%，比兰宏等(1995)报道的 0.122%要低。从$\overline{P}$值、$\overline{\pi}$值均说明浙江地区猪的遗传多样性贫乏，即群体的分化程度处于一个相当低的水平，说明它们有很近的亲缘关系。这些结果与吴小秋②从血液蛋白多态性对浙江地方猪进行研究的结果相吻合，也与黄勇富①研究整个中国地方品种猪 mtDNA 遗传多样性的结果相吻合。

① 黄勇富，1996. 中国地方猪种遗传多样性及亲缘分化关系. 四川农业大学，博士论文

② 吴小秋，1996. 全国地方猪血液蛋白多态性研究. 贵州农学院，硕士论文

然而，这一结果与猪的形态、生态学特征存在丰富的遗传多样性形成了鲜明的对比，这种差异可能是长期人工定向选择的结果。

3.2 浙江家猪的起源

根据表 2，浙江野猪的单倍型为基本型Ⅰ，即浙江地方品种猪与浙江野猪间有共享的单倍型；从图 2 也可看出，浙江地方猪与浙江野猪的关系较近。值得指出的是，浙江地方猪与四川野猪、河南野猪和越南野猪间存在差异，没有共享的单倍型[①][②](兰宏等，1995)，因此，浙江地方品种猪可能起源于浙江野猪。然而有趣的是，根据共用的几个限制性内切酶的数据，在日本野猪和基本型（Ⅰ型）间未检出差异（Watanabe 等，1985)，提示日本野猪与浙江野猪具有较近的亲缘关系；而与河南野猪、越南野猪和四川野猪的关系稍远。遗憾的是，日本野猪的数据有限，日本野猪的起源是否与我国东部沿海地区的野猪有关值得研究。

3.3 金华Ⅲ系猪的起源

在浙江地方猪中，金华Ⅲ系 1 头个体的单倍型为Ⅲ型，其他 2 头则为基本型Ⅰ型。由图 1 可知，在全国地方猪中，作为金华Ⅲ系猪的Ⅲ型最后聚类，其他Ⅰ先和Ⅳ′聚类，再与Ⅴ′聚类，说明该Ⅲ系猪个体与其他浙江地方猪的亲缘关系比全国地方猪与浙江地方猪的还远，其单倍型特征为 *Bam*HⅠ-B-*Bcl*Ⅰ-B-*Dra*Ⅰ-B(B 型)；而Ⅰ型则为 *Bam*HⅠ-A-*Bcl*Ⅰ-A-*Dra*Ⅰ-A（A 型)。而 Watanabe 等(1985)和黄勇富[①]对欧亚猪种和全国地方品种 mtDNA RFLP 研究结果发现该 3 种酶无多态位点。由于 mtDNA 呈严格的母系遗传，这提示该Ⅲ系猪个体可能来源于另外一个母系，即金华Ⅲ系内可能存在两个母系集团。这种推测还有待于扩大样本数，并从核 DNA 方面进一步确证。

表 3　MtDNA 单倍型间的片段共享度(右上三角)和遗传距离(左下三角)

Table 3　The proportion of shared fragments (the upper-right matrix) and genetic distances (the lower-left) among the restriction haplotypes

单倍型	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ	Ⅳ′	Ⅴ′
Ⅰ	70	0.950	0.921	0.910	0.883	0.979	0.978
Ⅱ	0.0029	69	0.870	0.860	0.833	0.928	0.957
Ⅲ	0.0046	0.0079	69	0.831	0.806	0.900	0.899
Ⅳ	0.0053	0.0085	0.0104	73	0.973	0.889	0.937
Ⅴ	0.0070	0.0103	0.0122	0.0015	75	0.904	0.910
Ⅳ′	0.0012	0.0041	0.0059	0.0066	0.0056	71	0.957
Ⅴ′	0.0012	0.0042	0.0060	0.0036	0.0053	0.0024	70

注：对角线上的数据是所检测到的片段数(the numbers on the diagonal are the restriction fragments detected)。

致谢　在实验中得到刘爱华研究员的关心和帮助；耿排力副教授、王文博士、宿兵博士、丁波博士和黄勇富博士等提供帮助；荀世康、禹一川、朱春玲、齐瑾等同志提供技术协助；宁海岔路猪良种繁育场刘国友、乐清市虹桥镇朱健、碧湖猪良种场李志林、郑建林、金华种猪场金根炉、东阳良种场李云芳、金华农校牧场陶志伦、双桥农场陈少平、江西畜牧兽医站站长、江西玉山黑猪原种场魏聪妹及浙江农业大学试验牧场张樟汀等同志为实验样品收集提供帮助；在此一并致谢。

① 黄勇富，1996. 中国地方猪种遗传多样性及亲缘分化关系. 四川农业大学，博士论文

② 秦树臻，1994 太湖猪核 DNA 和线粒体 DNA 遗传变异的研究. 南京师范大学，博士论文

参 考 文 献

王 文，施立明，1993. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法. 动物学研究，14(2)：197—198.

中国猪品种志编写组，1986. 中国猪品种志. 上海：上海科学技术出版社.

兰 宏，施立明，1995. 西南地区家猪和野猪 mtDNA 遗传多样性研究. 遗传学报，20(5)：28—33.

张亚平，施立明，1992. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. 动物学研究，13(3)：289—298.

吴 平，周开亚，秦树臻，1995. 二花脸猪与华北野猪线粒体DNA限制性位点图的比较研究. 中国动物遗传育种研究，北京：中国农业科技出版社. 86—89.

Nei M, Li W H, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad Sci. US.*, **76**: 5269—5273.

Watanabe T, Hayashi Y, Ogasawara N *et al*, 1985. Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease cleavage patterns. *Biochem. Genet.*, **23**: 105—113.

Watanabe T, Hayashi Y, Kimura J *et al*, 1986. Pig mitochondrial DNA: polymorphism, restriction map orientation and sequence data. *Biochem. Genet.*, **24**: 385—396.

GENETIC DIVERSITY OF ZHEJIANG NATIVE PIG BREEDS INFERRED FROM MITOCHONDRIAL DNA POLYMORPHISM

ZHANG Sheng-qiao[①②] XU Ji-chu[①] ZHANG Ya-ping[②③]
FU Yan[①] CHEN Yong-jiu[②]

(① *Animal Science College, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou* 310029)

(② *Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

Abstract

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of mitochondrial DNA (mtDNA) from Zhejiang native pigs and wild boars was analyzed by using 25 restriction endonucleases, i. e. *Apa* Ⅰ, *Ava* Ⅰ, *Bam*H Ⅰ, *Bcl* Ⅰ, *Bgl* Ⅰ, *Bgl* Ⅱ, *Cla* Ⅰ, *Dra* Ⅰ, *Eco*R Ⅰ, *Eco*R Ⅴ, *Hae* Ⅱ, *Hinc* Ⅱ, *Hind* Ⅲ, *Hpa* Ⅰ, *Kpn* Ⅰ, *Pst* Ⅰ, *Pvu* Ⅰ, *Pvu* Ⅱ, *Sac* Ⅱ, *Sal* Ⅰ, *Sca* Ⅰ, *Sma* Ⅰ, *Stu* Ⅰ, *Xba* Ⅰ and *Xho* Ⅰ, which recognize six nucleotides. In the 30 analyzed individuals, 30 restriction morphs, which could be sorted into 3 haplotypes, were detected. Four new morphs, i. e. *Bam*H Ⅰ-B, *Bcl* Ⅰ-B, *Dra* Ⅰ-B and *Xba* Ⅰ-C were detected. The average genetic distance ($\overline{P}$) was 0.005, and the value of average nucleotide diversity ($\overline{\pi}$) in pig population (including native pigs and wild boars) was 0.0008. This suggested that the genetic diversity of pigs was remarkably scarce. The pigs in Zhejiang might have originated from a late common ancester. Combining with the data from previously reports, it was suggested that the Jinhua strain Ⅲ pigs may have two female origins.

Key words Mitochondrial DNA, Restriction fragment length polymorphism, Pig

③ To whom correspondence should be addressed